动 物 学 研 究 2010，Feb. 31(1)：27−34 CN 53-1040/Q ISSN 0254-5853
Zoological Research DOI：10.3724/SP.J.1141.2010.01027

昆虫抗菌肽结构、性质和基因调控

王义鹏[1,2]，赖 仞[1,*]

(1. 中国科学院昆明动物研究所 动物模型与人类疾病机理重点实验室，云南 昆明 650223；2. 中国科学院研究生院，北京 100049)

摘要：昆虫抗菌肽是昆虫先天免疫系统中非常重要的一类效应分子。昆虫抗菌肽带正电荷，分子量小，大多数少于 100 个氨基酸残基。根据结构可以将昆虫抗菌肽分为一些不同的家族。昆虫抗菌肽不同的抗菌谱表明，它具有不同的作用机制。以果蝇为模式生物研究表明，昆虫抗菌肽的基因调控涉及到多个信号通路及大量的信号分子。

关键词：昆虫抗菌肽；先天免疫；分类；结构；性质；基因调控
中图分类号：Q966；Q516；Q786 **文献标识码：**A **文章编号：**0254-5853-(2010)01-0027-08

Insect Antimicrobial Peptides: Structures, Properties and Gene Regulation

WANG Yi-Peng[1,2]，LAI Ren[1,*]

(1. *Kunming Institute of Zoology, the Chinese Academy of Sciences, Kunming* 650223, *China;*
2. *Graduate University of the Chinese Academy of Sciences, Beijing* 100049, *China*)

Abstract: Insect antimicrobial peptides (AMPs) are an important group of insect innate immunity effectors. Insect AMPs are cationic and contain less than 100 amino acid residues. According to structure, insect AMPs can be divided into a limited number of families. The diverse antimicrobial spectrum of insect AMPs may indicate different modes of action. Research on the model organism *Drosophila* indicate that insect AMPs gene regulation involves multiple signaling pathways and a large number of signaling molecules.

Key words: Insect antimicrobial peptides; Innate immunity; Classification; Structures; Properties; Gene regulation

生物体随时随地都面临着微生物的挑战，它们需要发展出一套有效的机制以抵御微生物病原体的侵袭。脊椎动物依靠先天免疫系统和后天性免疫系统来杀灭外界微生物，但无脊椎动物缺乏后天免疫系统，只能依靠先天免疫系统来抵御外界微生物。抗菌肽作为抵御微生物入侵的第一道防线，担负了极其重要的功能，尤其是没有后天免疫系统的无脊椎动物和后天免疫系统脆弱的低等脊椎动物，必须依靠主要由抗菌肽组成的先天免疫系统来抵御病原微生物的感染。抗菌肽根据其结构主要可以分为 3 大类：(1) α-螺旋抗菌肽；(2) 环型抗菌肽，包括头尾封闭的环型抗菌肽和头尾不封闭，但是分子结构中存在二硫键的环型抗菌肽；(3) 分子结构中含有大量特殊氨基酸（如脯氨酸、甘氨酸）的抗菌肽。大部分抗菌肽相对分子质量小于 1.0×10^4，具有疏水性，整个分子带正电。它们同时具有亲水性和亲脂性形成的两亲性二级结构（包括α-螺旋、β-折叠、β发夹样β-折叠，以及α-螺旋与β-折叠的混合结构）。还有一些特殊结构的抗菌肽(Leippe et al, 1999)。

昆虫是世界上最大的生物种群，种类繁多，达几百万种，个体数量超过 10^{18}，约占整个动物界数量的 90%，而且分布广泛。昆虫之所以能够在残酷的进化过程中获得成功并具有如此大的种群数量和多样性是由于具有以下几个特点：（1）具有比大多数脊椎动物短的生命周期；（2）具有极强的

收稿日期：2009-12-22；接受日期：2009-12-31
基金项目：国家自然科学基金重点项目（30830021）
*通讯作者（Corresponding author），E-mail: rlai@mail.kiz.ac.cn
第一作者简介：王义鹏，男，博士研究生，主要从事两栖、爬行和昆虫来源活性多肽和蛋白质的功能研究

适应能力，能够十分容易地适应新的环境并且能够以几乎绝大多数植物和动物为食；（3）具有非常强大的免疫系统，能够高效地抵御外界微生物的侵袭 (Bulet et al, 2005)。昆虫的免疫系统具有以下特点：（1）不具有高等动物那样高度专一的免疫体系，缺乏B和T淋巴细胞，无免疫球蛋白及补体产生，抗菌肽作为免疫体系中的关键组分。昆虫抗菌肽主要是在昆虫的脂肪体（与哺乳动物的肝脏功能类似）和血细胞中合成，在其它一些组织中也会少量合成，例如再生组织、表皮细胞等。合成后的抗菌肽为前体结构，由信号肽和成熟肽（有些在成熟肽之前或者之后具有间隔肽）组成，在体内经过酶切作用，成熟肽被释放并分泌到血淋巴（与脊椎动物的血液功能类似）中，从而可在昆虫体内的各个部分发挥作用(Liu et al, 2006)。（2）昆虫抗菌肽具有分子量小、热稳定性强、水溶性好、无免疫原性、强碱性、抗菌谱广等特点。昆虫抗菌肽不仅对细菌和真菌有广谱杀灭作用，而且对病毒、原虫及癌细胞也有杀伤作用。其作用机制独特，不损害或破坏高等动物的正常细胞(Cruciani et al, 1991)。

1 昆虫抗菌肽分类、结构及性质

昆虫抗菌肽在自然界中分布广泛，来源众多。据初步统计，目前人们已对 8 目 30 多种昆虫进行了诱导免疫的研究，主要集中于鳞翅目(Lepidoptera)、鞘翅目(Coleoptera)、双翅目(Diptera)、膜翅目(Hymenoptera)，还有半翅目(Hemiptem)、等翅目(Isoptera)、同翅目(Homoptem)及蜻蜓目(Odonata)，总共发现了 200 多种昆虫抗菌肽。不同昆虫中存在的抗菌物质有所不同(Lamberty et al, 2001)。

按照昆虫抗菌肽结构和氨基酸组成，它分为以下几类：

1.1 线型双亲α-螺旋抗菌肽

第一个昆虫抗菌肽是天蚕肽(cecropins)，由 Boman et al（1974)从经过细菌诱导的惜古比天蚕(*Hyalophora cecreopia*)蛹血淋巴中分离得到。此后，有 60 多个 cecropins 类似物从鳞翅目(Lepidoptera)和双翅目(Diptera)昆虫的血淋巴中分离得到，这是数量最多的昆虫抗菌多肽。这类昆虫抗菌肽有 29～42 个氨基酸残基组成，在第一或者第二氨基酸残基位置大都具有色氨酸残基，且 C-末端氨基酸酰胺化。少数缺乏色氨酸残基的 cecropins 类似物对革兰氏阳性菌和酵母菌有更强的抗菌活性。C-末端氨基酸酰胺化使整个多肽具有更强的阳离子化程度，增加了抗菌效率(Bulet et al, 1999)，但是，并不是所有已经发现的 cecropins 抗菌肽具有以上特点，如来源于白纹伊蚊(*Aedes albopictus*)和埃及伊蚊(*Aedes aegypti*)的 cecropins 在第一、二位没有色氨酸残基，并且 C-末端氨基酸未酰胺化(Sun et al, 1998; Sun et al, 1999; Lowenberger et al, 1999)；来源于冈比亚按蚊(*Anopheles gambiae*)的 cecropins 则只具有 C-末端酰胺化结构，而无色氨酸残基(Vizioli et al, 2000)。

此外，还有一些与 cecropins 结构相似，但是不属于 cecropins 的昆虫 α-螺旋抗菌肽(cecropin-like peptide)，如来源于厩螫蝇(*Stomoxys calcitrans*)的 stomoxyn，由 42 个氨基酸组成，是最长的 cecropin 样抗菌肽(Boulanger et al, 2002)；来源于白蚁(*Pseudacanthotermes spiniger*)的 spinigerin，由 25 个氨基酸组成(Lamberty et al, 2001)；来源于地中海果蝇(*Cerratitis capitata*)的 ceratotoxins，由 29 个氨基酸残基组成(Marchini et al, 1995)。与大多数分泌到血淋巴中的昆虫抗菌肽不同，stomoxyn、spinigerin、ceratotoxins 并非细菌诱导产生，它们分别在昆虫的中肠、血细胞和雌性副腺中组成型表达。

其他昆虫 α-螺旋抗菌多肽主要来源于一些有毒昆虫的毒液，如蜂毒肽(melittin)由 27 个氨基酸组成，来源于蜜蜂的毒液(Vlasak et al, 1983)；来源于欧洲大黄蜂(*Vespa crabro*)，由 13 个氨基酸组成的 carbrolin (Krishnakumari et al, 1997)。从蚂蚁(*Pachycondylas goeldii*)的毒液中分离得到 ponericins，这类抗菌肽分为 3 个亚家族，包含有 15 个成员，它们与 cecropins 有 60%左右的序列相似性，也含有色氨酸，但是缺乏 C-末端氨基酸酰胺化(Orivel et al, 2001)。

昆虫 α-螺旋抗菌多肽对细菌的杀菌作用要强于真菌；对革兰氏阴性细菌的作用要强于革兰氏阳性细菌，同时在有效杀菌浓度范围内不具有溶血活性。此外， Bulet et al（2003）的研究发现，cecropins 和 cecropin 样抗菌肽可能具有影响植物和人类致病丝状真菌(*Aspergillus* spp，*Fusarium* spp)以及酵母生长的作用。有意思的是，stomoxyn 除了具有广谱的抗菌活性以外，还具有溶解锥虫的活性(Boulanger et al, 2002)。构效关系研究表明，包括带电荷数、螺旋度、分子大小、疏水力矩和疏水性等（Tossi et al, 2000）在内的一些参数可能会影响昆虫 α-螺旋抗

菌多肽的抗菌活性，。

Steiner et al（1982) 首次用圆二色谱(CD spectroscopy)的方法对 *Hyalophora* cecropin A 的二级结构进行了研究，其结果表明，cecropin A 在水溶液中为无规卷曲结构；而在疏水的环境中则转变为相对稳定的 α-螺旋结构。用磁共振(NMR)方法对 cecropin A 的结构进一步研究发现，cecropin A 具有一个长的 N-末端、碱性、两亲性的 α-螺旋(5~21 位残基)和一个短的、疏水的 C-末端 α-螺旋(24~37 位残基)，这两段 α-螺旋由一个 Gly-Pro 铰链区连接。

1.2 具有二硫键的环状或末端开放的抗菌肽

很多抗菌肽含有多个半胱氨酸形成的分子内二硫键，它们常常在溶液中形成 β-折叠二级结构。由于二硫键数量的不同和配对方式的差异，这些抗菌肽可以形成如下一些二级结构：3 带 β-折叠，如大多数脊椎动物防御素(defensin)；β-发夹结构，如来源于节肢动物的 thanatin、androctonin、gomesin、tachyplesin，和来源于两栖类动物的 brevinins、esculentins；α-螺旋和 β-折叠的混合结构，如无脊椎动物防御素，植物防御素和动物防御素。

1.2.1 具有一对二硫键的昆虫发夹样β-折叠抗菌肽 到目前为止只发现一种该类昆虫抗菌肽——来源于半翅目昆虫刺肩蝽(*Podisus maculiventris*)的 thanatin (Fehlbaum et al, 1996)。Thanatin含有21个氨基酸残基，其中包括两个半胱氨酸残基，与两栖类来源的brevinins抗菌肽家族具有40%的同源性。Thanatin具有广谱的抗菌活性，在μM浓度就可以抑制革兰氏阳性细菌、革兰氏阴性细菌、丝状真菌和酵母的生长，且不具有溶血活性。Pagès et al (2003) 研究表明，thanatin对从临床分离的多重耐药菌 *Enterobacter aerogenes*和*Klepsiella pneumonia*同样具有抗菌作用，同时表明thanatin的抗菌活性与革兰氏阴性细菌细胞壁上的脂多糖(LPS)有关(Pagès et al, 2003)。有趣的是，人工合成的由D-型氨基酸构成的thanatin对所有的革兰氏阴性细菌和部分革兰氏阳性细菌没有活性，但是仍然具有对真菌的活性(Fehlbaum et al, 1996)。这表明thanatin对不同的微生物采取不同的作用机制，包括与细菌作用靶点的立体特异性相互作用。进一步构效关系研究（Fehlbaum et al，1996； Lee et al，2002；Taguchi et al，2000）表明：(1) 去除C-末端Met残基的thanatin失去抗革兰氏阴性细菌的活性，而去除C-末端两个氨基酸残基的thanatin则完全丧失活性；(2) 去除N-末端5个氨基酸残基的thanatin仍然具有对部分革兰氏阴性细菌的抗菌活性，而进一步去除N-末端2个氨基酸残基则会导致thanatin活性大大降低；(3) 去除C-端环状结构内部的氨基酸残基会增加thanatin对革兰氏阳性菌的抗菌活性，而在环状结构内部插入一个Ala残基则会导致thanatin对所有细菌的抗菌活性下降；(4) C-端两个反向平行的β-折叠之间的氢键的存在对thanatin的活性是必需的。

Thanatin 由一个高度柔性的 N-端区域和一个 C-端阳离子环 CNRRTGKC（命名为昆虫环，类似于两栖类抗菌肽的 Rana 盒）构成。磁共振实验结果表明，thanatin 的 C-端为两个反向平行的 β-折叠结构，由一对分子内二硫键连接固定形成环状的结构。环状结构末端延伸出一个柔性的 N-端尾巴 (Taguchi et al, 2000; Mandard et al, 1998)。

Thanatin 是一个优良的新型抗菌药药物模板，因为其具有以下优点：(1) 对真核生物细胞无毒性；(2) 抗菌活性强，尤其是对许多临床耐药菌有活性；(3) 作用机制多样，对不同微生物有不同作用方式；(4) 分子小，方便构效关系研究。

1.2.2 昆虫防御素 首先从双翅目昆虫褐尾麻蝇(*Sarcophaga peregrine*)和肉蝇(*Phormia terranovae*)体内发现，然后其他昆虫中也陆续发现有防御素存在(Matsuyama et al, 1988; Lambert et al, 1989)。到目前为止，从双翅目、鳞翅目、鞘翅目、膜翅目和蜻蜓目昆虫中共发现超过60种防御素。然而，让人费解的是，亲缘关系近的昆虫来源的防御素之间的序列差异反而比亲缘关系远的昆虫来源的防御素之间的序列差异大，比如蜻蜓的防御素的氨基酸序列与软体动物和蝎子的防御素更加接近，同源性超过75%，而与双翅目昆虫的防御素的同源性仅为35%(Bulet et al, 1999)。

昆虫防御素分子量小，一般含有 34～46 个氨基酸残基，带正电荷，含有 3～4 对分子内二硫键。也有一些昆虫来源的防御素则由于 C-和 N-末端的延伸，引起氨基酸序列的增加，如从厩螯蝇(*Stomoxys calcitrans*)中肠中发现的防御素就具有 N-末端延伸结构(Lehane et al, 1997)；而从熊蜂(*Bombus pascuorum*)和蜜蜂蜂王浆中发现的防御素则具有 C-末端延伸结构(Fujiwara et al, 1990)。 此外，最近从刺舌蝇(*Glossina morsitans*)中发现了一个只含有 33 个氨基酸残基的防御素(Boulanger et al, 2002)。与昆虫 cecropins 一般存在 C-末端酰胺化不

同，截至目前，只发现两种昆虫防御素（蜜蜂royalisin和大黄蜂防御素)具有C-末端酰胺化结构。

根据抗菌活性不同，昆虫防御素可以分为抗真菌防御素和抗细菌防御素。截至目前，已经发现大量的抗细菌防御素;而抗真菌防御素只发现了5种：drosomycin 来源于果蝇(*Drosophilia melanogaster*)(Yang et al, 2006)；heliomicin来源于鳞翅目昆虫(*Heliothis virescens*)(Lamberty et al, 2001)； termicin 来源于白蚁(*Pseudacanthothermes spiniger*)(Lamberty et al, 2001)；gallerimycin来源于白蜡虫(*Galleria mellonella*)幼虫(Schuhmann et al, 2003)； Alo13 来源于长臂天牛(*Acrocinus longimanus*)(Barbault et al, 2003)。

昆虫抗细菌防御素对革兰氏阳性细菌（包括一些人类病原菌）杀菌活性非常强，其最小抑菌浓度(MIC)值一般低于μmol/L水平。而革兰氏阴性细菌、酵母和丝状真菌对这些防御素的敏感性相对偏低。昆虫抗细菌防御素的杀菌作用十分迅速，大多数在不到1 min的时间内就可以杀灭细菌。此外，昆虫抗细菌防御素在浓度高达数百 μmol/L 时，仍无溶血活性。然而，昆虫抗细菌防御素的活性与离子强度有关，在低离子强度条件下抗菌活性强，随着离子强度的升高，抗菌活性迅速降低。昆虫抗细菌防御素的作用机制复杂，黑花蝇属(*Phormia*)防御素能破坏藤黄球菌细胞膜的通透性屏障，导致细菌细胞质内钾离子流失、内膜部分去极化、细胞质 ATP水平下降和细胞呼吸受到抑制，最终导致细菌细胞的死亡(Cociancich et al, 1993)。

相对于抗细菌防御素，drosomycin、heliomicin和termicin是严格的抗真菌多肽，它们通过抑制孢子萌发或菌丝穿孔的方式来影响多种真菌的生长。Termicin 也具有抗部分革兰氏阳性细菌的活性。Heliomicin 在生理盐离子强度条件下，保持其抗菌活性；而drosomycin在这样的渗透压条件下抗菌活性显著降低，这表明heliomicin与其他昆虫防御素具有不同的作用方式。

Bulet et al（2003）和Thevissen et al（2004)用1H-NMR 方法对几种昆虫防御素的三维结构研究的结果显示，黑花蝇属(*Phormia*)和麻蝇属(*Sarcophaga*)抗细菌防御素以及白蚁抗真菌防御素termicin具有一个 α-螺旋结构域和两个反向平行的α-片层结构域，两对分子内二硫键在两者之间起到稳定的作用(αββ)。抗真菌防御素 heliomicin 和drosomycin分子内多出一个短的N-末端β-片层结构域(βαββ)来源于长臂天牛的抗真菌防御素Alo13具有典型和唯一的三股β-片层结构(βββ)。

1.3 富含脯氨酸的抗菌肽

这类抗菌肽为线性分子，由 14～39 个氨基酸残基组成。根据分子大小可分为两个亚族：短链亚族（小于20个氨基酸残基）和长链亚族（大于20个氨基酸残基）。目前这类抗菌肽已在蜜蜂和胡蜂(abaecins，apidaecins)、蚂蚁(formaecins)、果蝇(drosocins，metchnikowins)、粉纹夜蛾(lebocins)和红椿(pyrrhocoricin，metalnikowins)中发现。

这类抗菌肽中Pro残基的含量非常高（超过氨基酸总含量的25%），同时，Pro残基常常与碱性氨基酸残基(Lys，Arg 和 His)连接形成二联体或者三联体(KP, RP, PRP, PHP)基序。这类基序既有可能均匀的分布于整个多肽序列中，也有可能集中分布于部分序列中。有意思的是，部分该类抗菌肽的Thr和Ser残基上存在O-连接的侧链糖基化修饰。目前已从果蝇、始红椿(*Pyrrhocoris apterus*)、家蚕和牛头蚁(*Myrmecia gulosa*)中发现具有这种糖基化修饰现象的抗菌肽存在。对于这种糖基化修饰的作用，现在的认识还存在矛盾。Drosocin 和 formaecin 的侧链单糖和双糖修饰能够提高其体外抗菌活性并稳定其构象(Bulet et al, 1996; Kaur et al, 2007)，而化学合成的不含糖基化修饰的pyrrhocoricin却比天然的O-连接的糖基化修饰的pyrrhocoricin抗菌活性强(Hoffmann et al, 1999)。此外，延长lebocins糖基化修饰的糖链的长度会降低其抗菌活性(Hara et al, 1995)。

短链亚族的富含脯氨酸的抗菌肽对肠杆菌科的革兰氏阴性菌具有高度的选择性，而对大多数革兰氏阳性细菌无活性。有趣的是，属于长链亚族的abaecins和lebocins对革兰氏阴性细菌和阳性细菌均有活性，而metchnikowin特异性的对丝状真菌有活性。 Lebocins的抗菌活性存在非常强的盐依赖性，甚至在生理盐浓度下，其活性也会显著降低。Lebocins和cecropin存在协同作用，当将两者混合时会大大提高其抗菌活性(Bulet et al, 1999)。

用磁共振(NMR)和圆二色谱(CD)的方法对drosocin 及其未糖基化的类似物进行构象分析，结果表明，该类似物在水溶液中均为无规卷曲的结构。加入三氟代乙醇的浓度至50% (v/v)，drosocin部分表现出有序的构象(McManus et al, 1999)。

对短链亚族的富含脯氨酸的抗菌肽的构效关系进行研究发现，该抗菌肽具有许多有趣的生物学性质。与 α-螺旋昆虫抗菌肽和具有二硫键的昆虫抗菌肽不同，短链亚族的富含脯氨酸的抗菌肽杀菌作用慢，一般需要数小时。此外，apidaecins、drosocins 和 pyrrhocoricins 的所有的 D-型对映异构体均无抗菌活性。这说明这些抗菌肽的抗菌机制与立体选择性有关，而并非常见的在细菌细胞膜上造成孔洞(Oren et al, 1998)。目前对于该类抗菌肽的作用机理已经提出了多个模型(Castle et al, 1999; Hoffmann et al, 1999; Otvos et al, 2000; Kragol et al, 2001; Cudic et al, 2002; Cudic et al, 2003)。

1.4　富含甘氨酸的抗菌肽

这类抗菌肽相对分子质量为 0.8～3.0×10^4，在各类昆虫中均有发现(Hetru et al, 1998)：双翅目(diptericins、attacins和sarcotoxins)、鳞翅目(attacins)、膜翅目(hymenoptaecins)、鞘翅目(coleoptericin、holotricin II和III，tenecin III)、半翅目(hemipdericin)。这类抗菌肽的共同特点是一级结构中富含甘氨酸，有些是全序列中富含甘氨酸，如hemipdericin、coleoptericin；有些是某一结构域中富含甘氨酸，如diptericins、sareotoxins、attacin等。部分富含甘氨酸的抗菌肽存在O-连接的侧链糖基化修饰现象，如来源于肉蝇(*P. terranovae*)的diptericins（Reichhart et al, 1989)。

Attacins 最先从惜古比天蚕(*Hyalophora cecropia*)中分离得到，总共有 6 种，相对分子质量超过 2.0×10^4，4 种呈碱性，另两种为中性或微酸性(Hultmark et al, 1983)。随后从一系列其他昆虫，如蓖麻蚕(*Samia cynthia ricini*)、家蚕(*Bombyx mori*)、果蝇(*Drosophila*)、家蝇(*Musca domestica*)中均有发现。这类抗菌肽抗菌活性较低，只对部分革兰氏阴性菌有抑制作用(Carisson et al, 1991)。其作用机制是通过破坏细菌细胞膜的完整性。有意思的是，刺舌蝇(*Glossina morsitans*)中发现的attacin除了对革兰氏阴性细菌具有抗菌活性外，还具有抗锥虫的活性(Hu et al, 2005)。

Sarcotoxins目前只在麻蝇中有发现，分为sarcotoxin I、II、III 3 种(Okada et al, 1984; Ando et al, 1987; Baba et al, 1987)，其相对分子质量为 0.4～3.0×10^4，其中sarcotoxin II相对分子质量为 3×10^4，是目前已经发现的最大的昆虫抗菌肽。sarcotoxin II在N-端约 15 个氨基酸处有一个富含Pro的P结构域，C-端约 250 个氨基酸处有一个富含Gly的结构域。该类抗菌肽对革兰氏阳性和阴性菌都有很强的抗菌活性。Sarcotoxin I的作用机制是通过破坏细菌细胞的膜电势而导致细菌的死亡。Sarcotoxin IA的二级结构为由铰链连接的 2 个α-螺旋，2 个α-螺旋区对sarcotoxin IA的活性是最重要的(Iwai et al, 1993)。

Diptericins最先通过细菌诱导的方法从肉蝇(*Phormia terranovae*)血淋巴中分离得到(Dimarcq et al, 1988)，随后在果蝇、褐尾麻蝇、家蝇、厩螫蝇、骚扰阿蚊、埃及伊蚊中也有发现。Diptericin A由 82 个氨基酸残基组成，相对分子质量约为 9×10^3，一级结构包括N-端富含Pro的结构域和C-端富含Gly的结构域。Diptericin A分子内含有两个O-连接的侧链糖基化修饰，这种糖基化修饰对Diptericin A的活性非常重要，去除糖基化修饰会导致其抗菌活性的丧失(Bulet et al, 1995)。

2　昆虫抗菌肽的基因调控

作为一种模式生物，果蝇的免疫系统最近几年研究的较为深入。果蝇由于缺乏后天免疫系统，同时遗传背景较为清楚，因此被认为是研究昆虫先天免疫反应的优良模型。我们将以黑腹果蝇(*Drosophila melanogaster*)为例，对昆虫抗菌肽的基因调控过程进行简要介绍。

到目前为止，已从果蝇中发现 7 个诱导表达的抗菌肽家族(Bulet et al, 2003)。这些抗菌肽既可作用于革兰氏阳性细菌(defensin)和革兰氏阴性细菌(diptericin, drosocin, attacins, cecropins)，也可以作用于真菌(drosomycin,metchnikowin)。果蝇由于微生物的感染，编码抗菌肽的基因被激活并在脂肪体组织中合成。合成的抗菌肽进一步分泌到血淋巴中发挥抗菌作用。经过微生物诱导的果蝇体内抗菌肽的浓度能够达到 0.5 mM，这个浓度远远高于体外抗菌实验中杀灭绝大多数病原菌所需抗菌肽浓度。

观察发现，果蝇被真菌感染后，编码具有抗真菌活性的抗菌肽的基因被激活，而具有抗细菌活性的抗菌肽的基因保持沉默。这说明果蝇可能具有区分细菌和真菌感染的机制(Lemaitre et al, 1997)。过去几年中，对果蝇免疫系统识别病原体的机制的研究取得了重要进展，发现了 Toll 和 Imd 两个不同的信号传导通路，并且利用遗传学和分子生物学的方法对这两个通路进行了详细的研究(Hultmark et al, 2003; Hoffmann et al, 2003; Levitin et al, 2008;

Ferrandon et al, 2007)。Hoffmann et al（2003）研究表明，果蝇对微生物的识别过程至少涉及到*semmelweis*基因的产物肽聚糖识别蛋白（PGRPs）和*osiris*基因的产物革兰氏阴性菌结合蛋白(GNBPs)等模式识别分子。Toll 和 Imd 信号通路同属于Rel/NF-κB 信号通路，通过活化的 Rel 蛋白进入细胞核中与 κB 因子结合，从而调节靶基因的表达。但是两者有所不同，Toll 信号通路主要是通过一系列级联反应激活具有抗真菌活性和部分抗革兰氏阳性细菌的抗菌肽的编码基因。真菌或革兰氏阳性细菌感染可以激活果蝇的 Toll 信号通路。相反，越来越多的证据表明Imd信号通路主要参与果蝇抵抗革兰氏阴性细菌和部分革兰氏阳性细菌感染的过程(Leclerc et al, 2004; Tanji et al, 2005)。由于有大量的文献对这两个信号通路进行了详细的介绍，而且关于果蝇天然免疫应答的研究进展迅速，因此在这里我们只对这两个信号通路的主要特点和激活步骤进行大体的介绍。

2.1 Toll信号通路

这个信号通路主要参与昆虫对真菌和部分革兰氏阳性细菌引起的感染的免疫应答，能够调节抗真菌抗菌肽 drosomycin，metchnikowin 的表达。Toll 信号通路的激活依赖于酶切形式的胱氨酸结细胞因子样蛋白（cystine-knot cytokine-like protein）Spaetzle。Spaetzle 为一种胞外蛋白，是果蝇 Toll 蛋白的天然配体。当果蝇受到病原菌感染诱导时，胞外模式识别分子 PGRP-SA 与病原体相关分子结合，进一步促使两个成熟的 Spaetzle 蛋白形成二聚体结构，结合到果蝇 Toll 蛋白的胞外结构域上，从而导致胞内结构域的激活。活化的胞内结构域可以将丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶 pelle、MyD88 和 Tube 形成的三聚体募集至胞膜受体复合物附近并使其磷酸化。活化的 pelle 引发 dorsal 抑制蛋白 cactus 的磷酸化及降解，转录因子 dorsal-related immunity factor (DIF，属于 Rel 家族)于是从 cactus-DIF 复合物中释放出来转位进入细胞核，引起 *drosomycin* 等相应抗菌肽靶基因的表达。Toll 信号通路除参与免疫应答外，还参与昆虫的发育调控过程。

2.2 Imd信号通路

这个信号通路主要参与昆虫对革兰氏阴性细菌和部分革兰氏阳性细菌引起的感染的免疫应答，能够调节抗革兰氏阴性细菌抗菌肽cecropins、drosocin、diptericin和attacins的基因表达。在病原菌感染诱导下，胞外模式识别分子PGRP-LC与病原体相关分子结合，激活Imd受体，活化的Imd受体经过一系列信号级联反应最终激活Relish蛋白(属于Rel家族)。活化的Relish蛋白被酶切成两部分，其N-端部分转位进入细胞核，与NF-κB转录因子相互作用，激活相关抗菌肽靶基因的表达。目前已知参与此条信号通路的蛋白有PGRP-LC、Imd、转化生长因子激活激酶(transforming growth factor activated kinase，TAK1)、dFADD、DmIKK、Relish等。参与该信号通路的模式识别分子除PGRP-LC外，还有PGRP-LE 和 PGRP-LF 等 (Maillet et al, 2008)。PGRP-LE参与另一种细胞内的信号传导途径。最近研究发现Imd信号通路还可以参与果蝇由病毒引起的免疫应答，但是不会激活抗菌肽基因的表达(Costa et al, 2009)。

3 展 望

昆虫作为世界上数量最大的生物种群，生活环境千差万别。为了适应各自不同的生活环境，它们必然进化出大量各种各样的免疫效应因子。同时由于昆虫缺乏后天免疫系统，抗菌肽是昆虫主要的免疫效应因子。因此，庞大的昆虫世界中必然存在着难以计数的抗菌肽资源。随着研究的逐步深入，越来越多的昆虫抗菌肽被发现。这些抗菌肽具有各自不同的结构、性质和活性，使得分类变得越来越复杂和困难。

最近几年，以果蝇和蚊子为模式生物，对于昆虫天然免疫的研究取得了巨大的进步。对病原体识别、信号转导、免疫应答等多个方面的认识都在逐步深入。越来越多的证据显示，昆虫天然免疫系统比人们预想的要复杂的多。同时，由于生物进化的保守性，昆虫天然免疫系统中的某些分子和信号通路与脊椎动物(包括人)，存在一定的相似性。通过对昆虫天然免疫系统的研究，可以帮助我们研究和认识更为复杂的人类免疫系统。

近些年来，由于抗生素的滥用，越来越多的致病菌出现耐药性，甚至出现了一些超级耐药菌，这对人类健康带来了巨大的威胁。寻找和开发新型抗微生物药物已经成为医学界亟待解决的难题。昆虫抗菌肽具有分子量小、热稳定性强、水溶性好、无免疫原性、强碱性、抗菌谱广等特点。它不仅对细菌和真菌有广谱杀灭作用，而且对病毒、原虫及癌细胞也有杀伤作用。与传统抗生素相比，其作用机

制独特，不易引起微生物的耐药性，绝大多数不损害或破坏高等动物的正常细胞。昆虫抗菌肽所具有的以上优点及丰富的资源含量使其成为开发新型抗微生物药物优秀的模板。

参考文献：

Ando K, Okada M, Natori S. 1987. Purification of sarcotoxin II, antibacterial proteins of *Sarcophaga peregrina* (flesh fly) larvae[J]. *Biochemistry*, **26**(1): 226-230.

Baba K, Okada M, Kawano T, Komano H, Natori S. 1987. Purification of sarcotoxin III,a new antibacterial protein of *Sarcophaga peregrine*[J]. *J Biochem*, **102**(1): 69-74.

Barbault F, Landon C, Guenneugues M, Meyer JP, Schott V, Dimarcq JL, Vovelle F. 2003. Solution structure of Alo-3: a new knottin-type antifungal peptide from the insect *Acrocinus longimanus*[J]. *Biochemistry*, **42**(49): 14434-14442.

Boman HG, Nilsson—Faye I, PauI K. 1974. Insect immunitv. Characteristics of an inducible cell—free antibacterial reaction in hemolymph of *Samia cynthia pupae*[J]. *Infect Immun*, **10**: 136-145.

Boulanger N, Munks RJ, Hamilton JV, Vovelle F, Brun R, Lehane MJ and Bulet P. 2002. Epithelial innate immunity. A novel antimicrobial peptide with antiparasitic activity in the blood-sucking insect *Stomoxys calcitrans*[J]. *J Biol Chem*, **277** (51): 49921-49926.

Bulet P, Charlet M, Hetru C. 2003. Antimicrobial peptides in insect immunity[M]// Ezekowitz RAB, Hoffmann JA. Innate Immunity. Totowa: Humana Press Inc, 89-107.

Bulet P, Hetru C, Dimarcq JL and Hoffmann D. 1999. Antimicrobial peptides in insects; structure and function[J]. *Dev Comp Immunol,* **23**: 329-344.

Bulet P, Hegy G, Lambert J, van Dorsselaer A, Hoffmann JA, Hetru C. 1995. Insect immunity. The inducible antibacterial peptide diptericin carries two O-glycans necessary for biological activity[J]. *Biochemistry*, **34**(22): 7394-7400.

Bulet P, Stöcklin R. 2005. Insect antimicrobial peptides: structures, properties and gene regulation[J]. *Protein Pept Lett*, **12**: 3-11.

Bulet P, Urge L, Ohresser S, Hetru C, Otvos L Jr. 1996. Enlarged scale chemical synthesis and range of activity of drosocin, an O-glycosylated antibacterial peptide of *Drosophila*[J]. *Eur J Biochem*, **238**(1): 64-69.

Carisson A, Engstrom P, Hennich H. 1991. Attacin, an antibacterial protein from *Hyalophora cecropia*, inhibits synthesis of outer membrane proteins in *Escherichia coli* by interfering with *omp* gene transcription[J]. *Infect Immun*, **59**(9): 3040-3044.

Castle M, Nazarian A, Yi SS, Tempst P. 1999. Analog lethal effects of apidaecin on *Escherichia coli* involves sequential molecular interactions with diverse targets[J]. *J Biol Chem*, **274**: 32555-32564.

Cociancich S, Ghazi A, Hetru C, Hoffmann JA, Letellier L. 1993. Insect defensin, an inducible antibacterial peptide, forms voltage-dependent channels in *Micrococcus luteus*[J]. *J Biol Chem*, **268**(26): 19239-19245.

Costa A, Jan E, Sarnow P, Schneider D. 2009. The Imd pathway is involved in antiviral immune responses in *Drosophila*[J]. *PLoS One*, **4**(10): e7436.

Cruciani RA, Barker JI, Zasloff M. 199l. Antibiotic magainins exert cytolytic activity against transformed cell lines through channel formation[J]. *Proc Natl Acad Sci* USA, **88**(9): 3792-3796.

Cudic M, Condie BA, Weiner DJ, Lysenko ES, Xiang ZQ, Insug O, Bulet P, Otvos L Jr. 2002. Development of novel antibacterial peptides that kill resistant isolates[J]. *Peptides*, **23**(12): 2071-2083.

Cudic M, Lockatell V, Johnson DE, Otvos L Jr. 2003. *In vitro* and *in vivo* activity of an antibacterial peptide analog against uropathogens[J]. *Peptides,* **24**: 807-820.

Dimarcq JL, Keppi E, Dunbar B, Lambert J, Reichhart JM, Hoffmann D, Rankine SM, Fothergill JE, Hoffmann JA. 1988. Insect immunity. Purification and characterization of a family of novel inducible antibacterial proteins from immunized larvae of the dipteran *Phormia terranovae* and complete amino-acid sequence of the predominant member, diptericin A[J]. *Eur J Biochem*, **171**(1-2): 17-22.

Fehlbaum P, Bulet P, Chernysh S, Briand JP, Roussel JP, Letellier L, Hetru C, Hoffmann JA. 1996. Structure-activity analysis of thanatin, a 21-residue inducible insect defense peptide with sequence homology to frog skin antimicrobial peptides[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*，**93**(3): 1221-1225.

Ferrandon D, Imler JL, Hetru C, Hoffmann JA. 2007. The *Drosophila* systemic immune response: sensing and signalling during bacterial and fungal infections[J]. *Nat Rev Immunol*, **7**(11): 862-874.

Fujiwara S, Imai J, Fujiwara M, Yaeshima T, Kawashima T, Kobayashi K. 1990. A potent antibacterial protein in royal jelly. Purification and determination of the primary structure of royalisin[J]. *J Biol Chem*, **265** (19): 11333-11337.

Hara S, Yamakawa M. 1995. A novel antibacterial peptide family isolated from the silkworm, *Bombyx mori*[J]. *Biochem J*, **310** (2): 651-656.

Hetru C, Ho.mann D, Bulet P. 1998. Antimicrobial peptides from insects [M]//Brey PT, Hultmark D. Molecular Mechanisms of Immune Responses in Insects. London: Chapman & Hall, 40-66.

Hoffmann R, Bulet P, Urge L, Otvös L Jr. 1999. Range of activity and metabolic stability of synthetic antibacterial glycopeptides from insects[J]. *Biochim Biophys Acta*, **1426**(3): 459-467.

Hoffmann JA. 2003. The immune response of *Drosophila[*J]. *Nature*, **426**(6962): 33-38.

Hultmark D, Engström A, Andersson K, Steiner H, Bennich H, Boman HG. 1983. Insect immunity. Attacins, a family of antibacterial proteins from *Hyalophora cecropia*[J]. *EMBO J*, **2**(4): 571-576.

Hultmark D. 2003. *Drosophila* immunity: paths and patterns[J]. *Curr Opin Immunol*, **15**(1): 12-19.

Hu Y, Aksoy S. 2005. An antimicrobial peptide with trypanocidal activity characterized from *Glossina morsitans morsitans*[J]. *Insect Biochem Mol Biol*, **35**(2): 105-115.

Iwai H, Nakajima Y, Natori S, Arata Y, Shimada I. 1993. Solution conformation of an antibacterial peptide, sarcotoxin IA, as determined by 1H-NMR[J]. *Eur J Biochem*, **217**(2): 639-644.

Kaur KJ, Pandey S, Salunke DM. 2007. Design of a functionally equivalent nonglycosylated analog of the glycopeptide antibiotic formaecin I[J]. *Protein Sci*, **16**(2): 309-315.

Kragol G, Lovas S, Varadi G, Condie BA, Hoffmann R, Otvos L Jr. 2001. The antibacterial peptide pyrrhocoricin inhibits the ATPase actions of DnaK and prevents chaperone-assisted protein folding[J]. *Biochemistry*, **40**(10): 3016-3026.

Krishnakumari V, Nagaraj R. 1997. Antimicrobial and hemolytic activities of crabrolin, a 13-residue peptide from the venom of the European hornet, *Vespa crabro*, and its analogs[J]. *J Pept Res*, **50**: 88-93.

Lamberty M, Caille A, Landon C, Tassin-Moindrot S, Hetru C, Bulet P, Vovelle F. 2001. Solution structures of the antifungal heliomicin and a selected variant with both antibacterial and antifungal activities[J]. *Biochemistry*, **40**: 11995-12003.

Lamberty M, Zachary D, Lanot R, Bordercau C, Robert A, Hoffmann J A, Bulet P. 2001. Constitutive expression of a cysteine-rich antifungal and linear antibacterial peptide in a termite insect[J]. *J Biol Chem*, **276**(6): 4085-4092.

Lambert J, Keppi E, Dimarcq JL, Wicker C, Reichhart JM, Dunbar B, Lepage P, Van Dorsselaer A, Hoffmann J, Fothergill J. 1989. Insect immunity: isolation from immune blood of the dipteran *Phormia terranovae* of two insect antibacterial peptides with sequence homology to rabbit lung macrophage bactericidal peptides[J]. *Proc Natl Acad Sci USA,* **86**(1): 262-266.

Leclerc V, Reichhart JM. 2004. The immune response of *Drosophila* melanogaster[J]. *Immunol Rev*, **198**:59-71.

Lee MK, Cha L, Lee SH, Hahm KS. 2002. Role of amino acid residues within the disulfide loop of thanatin, a potent antibiotic peptide[J]. *J Biochem Mol Biol*, **35**(3): 291-296.

Lehane MJ, Wu D, Lehane SM. 1997. Midgut-specific immune molecules are produced by the blood-sucking insect *Stomoxys calcitrans*[J]. *Proc Natl Acad Sci USA,* **94**: 11502-11507.

Leippe M. 1999. Antimicrobial and cytolytic polypeptides of amoeboid protozoa-effector molecules of primitive phagocytes[J]. *Dev Comp Immunol*, **23**: 267-279.

Lemaitre B, Reichhart JM, Hoffmann JA. 1997. *Drosophila* host defense: differential induction of antimicrobial peptide genes after infection by various classes of microorganisms[J]. *Proc Natl Acad Sci USA,* **94**(26): 14614-14619.

Levitin A, Whiteway M. 2008. *Drosophila* innate immunity and response to fungal infections[J]. *Cell Microbiol,* **10**(5): 1021-1026.

Liu JT, Su ZJ, Wang FH, Li GH, Song SY. 2006. Progresses on insect antimicrobial peptides[J]. *Nat Enemies Insect* **28**(1): 36-43. [刘建涛, 苏志坚, 王方海, 李广宏, 宋少云. 2006. 昆虫抗菌肽的研究进展. 昆虫天敌, **28**(1): 36-43.]

Lowenberger C, Charlet M, Vizioli J, Kamal S, Richman A, Christensen BM, Bulet P. 1999. Antimicrobial activity spectrum, cDNA cloning, and mRNA expression of a newly isolated member of the cecropin family from the mosquito vector *Aedes aegypti*[J]. *J Biol Chem,* **274**: 20092-20097.

Maillet F, Bischoff V, Vignal C, Hoffmann J, Royet J. 2008. The *Drosophila* peptidoglycan recognition protein PGRP-LF blocks PGRP-LC and IMD/JNK pathway activation[J]. *Cell Host Microbe*, **3**(5): 293-303.

Mandard N, Sodano P, Labbe H, Bonmatin JM, Bulet P, Hetru C, Ptak M, Vovelle F. 1998. Solution structure of thanatin, a potent bactericidal and fungicidal insect peptide, determined from proton two-dimensional nuclear magnetic resonance data[J]. *Eur J Biochem*, **256**(2): 404-410.

Marchini D, Manetti AG, Rosetto M, Bernini LF, Telford JL, Baldari CT and Dallai R. 1995. cDNA sequence and expression of the ceratotoxin gene encoding an antibacterial sex-specific peptide from the medfly *Ceratitis capitata* (diptera)[J]. *J Biol Chem*, **270** (11): 6199-6204.

Matsuyama K, Natori S. 1988. Purification of three antibacterial proteins from the culture medium of NIH-Sape-4, an embryonic cell line of *Sarcophaga peregrine*[J]. *J Biol Chem*, **263**(32): 17112-17116.

McManus AM, Otvos L Jr, Hoffmann R, Craik DJ. 1999. Conformational studies by NMR of the antimicrobial peptide, drosocin, and its non-glycosylated derivative: effects of glycosylation on solution conformation[J]. *Biochemistry*, **38**(2): 705-714.

Okada M, Natori S. 1984. Mode of action of a bactericidal protein induced in the haemolymph of *Sarcophaga peregrina* (flesh-fly) larvae[J]. *Biochem J*, **222**(1): 119-124.

Oren Z, Shai Y. 1998. Mode of action of linear amphipathic α-helical antimicrobial peptides[J]. *Biopolymers*, **47**(6): 451-463.

Orivel J, Redeker V, Le Caer JP, Krier F, Revol-Junelles AM, Longeon A, Chaffotte A, Dejean A, Rossier J. 2001. Ponericins, new antibacterial and insecticidal peptides from the venom of the ant *Pachycondyla goeldii*[J]. *J Biol Chem*, **276**: 17823-17829.

Otvos L Jr, O I, Rogers ME, Consolvo PJ, Condie BA, Lovas S, Bulet P, Blaszczyk-Thurin M. 2000. Interaction between heat shock proteins and antimicrobial peptides[J]. *Biochemistry*, **39**(46): 14150-14159.

Pagès JM, Dimarcq JL, Quenin S and Hetru C. 2003. Thanatin activity on multidrug resistant clinical isolates of *Enterobacter aerogenes* and *Klebsiella pneumoniae*[J]. *Int J Antimicrob Agents*, **22**: 265-269.

Reichhart JM, Essrich M, Dimarcq JL, Hoffmann D, Hoffmann JA, Lagueux M. 1989. Insect immunity. Isolation of cDNA clones corresponding to diptericin, an inducible antibacterial peptide from *Phormia terranovae* (Diptera)[J]. *Eur J Biochem*, **182** (2): 423-427.

Schuhmann B, Seitz V, Vilcinskas A, Podsiadlowski L. 2003. Cloning and expression of gallerimycin, an antifungal peptide expressed in immune response of greater wax moth larvae, *Galleria mellonella*[J]. *Arch Insect Biochem Physiol*, **53**: 125-133.

Steiner H. 1982. Secondary structure of the cecropins: antibacterial peptides from the moth *Hyalophora cecropia*[J]. *FEBS Lett*, **137**: 283-287.

Sun D, Eccleston ED, Fallon AM. 1998. Peptide sequence of an antibiotic cecropin from the vector mosquito, *Aedes albopictus*[J]. *Biochem Biophys Res Commun,* **249**: 410-415.

Sun D, Eccleston ED, Fallon AM. 1999. Cloning and expression of three cecropin cDNAs from a mosquito cell line[J]. *FEBS letters*, **454**: 147-151.

Taguchi S, Kuwasako K, Suenaga A, Okada M, and Momose H. 2000. Functional mapping against *Escherichia coli* for the broad spectrum antimicrobial peptide, thanatin, based on an *in vivo* monitoring assay system[J]. *J Biochem*, **128**(5): 745-754.

Tanji T, Ip YT. 2005. Regulators of the Toll and Imd pathways in the *Drosophila* innate immune response[J]. *Trends Immunol*, **26**(4): 193-198.

Thevissen K, Warnecke DC, François IE, Leipelt M, Heinz E, Ott C, Zähringer U, Thomma BP, Ferket KK, Cammue BP. 2004. Defensins from insects and plants interact with fungal glucosylceramides[J]. *J Biol Chem*, **279**(6): 3900-3905.

Tossi A, Sandri L, Giangaspero A. 2000. Amphipathic, α-helical antimicrobial peptides[J]. *Biopolymers*, 55(1): 4-30.

Vizioli J, Bulet P, Charlet M, Lowenberger C, Blass C, Müller HM, Dimopoulos G, Hoffmann J, Kafatos FC, Richman A. 2000. Cloning and analysis of a cecropin gene from the malaria vector mosquito, Anopheles gambiae[J]. *Insect Mol Biol*, 9: 75-84.

Vlasak R, Unger-Ullmann C, Kreil G and Frischauf AM. 1983. Nucleotide sequence of cloned cDNA coding for honeybee prepromelittin[J]. *Eur J Biochem*, **135** (1): 123-126.

Yang WY, Wen SY, Huang YD, Ye MQ, Deng XJ, Han D, Xia QY, Cao Y. 2006. Functional divergence of six isoforms of antifungal peptide Drosomycin in *Drosophila melanogaster*[J]. *Gene*, **379**: 26-32.